

组织培养在马铃薯育种上的研究进展

杨林栋, 郭瑞锋, 皇甫红芳

(山西省农科院高寒区作物研究所, 大同 037008)

摘 要: 马铃薯茎尖组织脱毒培养, 愈伤组织解除分化形成新个体时, 体细胞有丝分裂的异染色质延迟复制行为较正常活体植株更严重, 后代变异较自然群体变异高出 500 倍, 若在培养过程添加辐射和化学诱变试剂变异率会更高。因此, 组织培养环境不只是现代生物技术辅助育种的一个重要条件, 更是诱变育种的一个有效途径, 对于以营养体繁殖的马铃薯作物效果更好。本文就组织培养在马铃薯育种上的发展历史、理论体系、应用现状、未来展望做一论述。

关键词: 茎尖体细胞; 组织培养; 变异

中图分类号: Q813.1², S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2004) 04-0224-04

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 属茄科茄属植物, 常见的育种途径有: 常规二倍体杂交法、四倍体水平的品种间杂交法、远缘种间杂交法、 $2n$ 配子利用法。这些途径都是通过有性生殖产生马铃薯变异体, 通过系谱、回交、轮回选择的方法, 需经过 6~8 代选出符合目标性状的新个体^[1]。进入 20 世纪 90 年代, 随着生物技术的深入发展, 人类对植物细胞遗传行为、基因表达传递行为达到分子水平深入了解, 作物育种工作者开始引入了除单纯户外有性杂交育种之外, 又一育种方法—室内体细胞无性系变异育种法, 其中组织培养 (tissue culture) 诱导再生植株的突变就是最常用的一种。当马铃薯

外植体 (茎尖脱毒分生组织) 培养时, 由于组培环境引发了细胞异染色质 DNA 延迟复制, 产生了较田间自然突变率高出 500 倍的大量变异^[2]。这一现象已越来越被马铃薯育种工作者所认可, 并成为一条马铃薯育种的有效途径。现从组织培养及组织培养在马铃薯育种上的发展历史、理论体系、应用现状、未来展望等方面逐一论述。

1 马铃薯及其它作物组织培养的发展简史

1902 年德国植物学家 Haberlandt 根据细胞学说, 提出高等植物器官和组织可以不断分割至单个细胞, 这个细胞具有潜在全能性功能。为证明这一观点, 他用被子植物的叶肉细胞、髓细胞、气孔保卫作材料进行离体培养, 由于营养条件不够了解, 实验未能成功, 但却起到先锋的作用。1904 年

收稿日期: 2003 - 10 - 30

作者简介: 杨林栋 (1970-), 男, 作物遗传育种硕士, 助理研究员, 主要从事脱毒马铃薯组织培养工作。

4 讨 论

本文介绍的组织培养容器, 与传统容器相比, 它是一种新材料制成的, 并由此带来对传统灭菌工艺的改进。它质地轻, 透光性好; 它的容积是常用容器的 20~30 倍, 而造价只是常用容器的两倍以上; 容器口径大, 接种或取小苗时操作者的手可以进入, 方便了操作, 提高工作效率; 容器内的方形

网眼状塑料板, 因其比重小于水, 浮在培养液上, 起着支撑小苗不被培养液浸泡的作用, 使小苗的成活率提高; 在同一容器内通过置换培养液、改变培养环境生产微型薯, 降低了微型薯的生产成本。可广泛用于马铃薯等具有芽、茎、根、小苗等器官形态植物材料组织培养的生产。本容器仍处在定性试验阶段, 各环节多因素的综合影响还有待进一步深入研究。

Hanning 最先在含无机盐及有机成分的培养基上成功地培养了萝卜和辣椒的胚, 发现离体的胚可以在培养基上充分发育, 并有提早萌发成苗现象。1922 年 Robbins 培养了长度为 1.45~3.75 cm 的豌豆作物茎尖, 结果形成了一些缺绿的叶和根。1933 年我国李继侗等曾在银杏离体培养时, 发现了 3 cm 以上大小的胚在培养基上即可正常生长, 其胚乳提取物能促进银杏离体胚的生长, 1934 年 White 通过对番茄根尖的组织培养, 建立了第一个有活跃生长的无性繁殖系。到这时有关离体实验才获得成功。1944 年 Morel 进行了葡萄茎尖组织培养的尝试, 获得了愈伤组织和根。1948 年 Skoog 和崔微发现, 腺嘌呤或腺苷可以解除生长素 (IAA) 对芽形成的抑制作用, 从而诱导烟草的茎段形成芽, 确立了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根分化的主要条件之一, 建立了器官形成的概念。1955 年 Skoog 及其同事在鲑鱼精子的提取物中发现了激动素, 它对促进芽的形成活性比腺嘌呤高出约 3 万倍。1957 年 Skoog 和 Miller 发现了激动素与生长素之间的不同比例的配合对生长和分化的作用, 即激动素与生长素之比高时易形成芽, 低时则形成根^[2-4]。

1955 年法国人莫勒尔和他的同事们, 以马铃薯茎尖为外植体成功地产生无病毒植株, 20 世纪 60 年代以后由于组织培养技术日趋成熟和完善, 世界各地的植物组织培养研究和产业化应用进入迅速发展阶段, 几乎所有的马铃薯生产国都使用这项技术进行脱毒快繁, 并部分地进行育种研究^[2,5]。

2 组织培养诱导突变的理论依据

植物组织培养是指植物的离体细胞、组织或器官在人工培养基上的生长、维持或分化。组织培养成功的依据是细胞的全能性、均等性、全息性^[2-4,6]。我们知道高等植物体具有十分复杂的组织和器官, 构成这些组织或器官的细胞, 其形态和功能也是各不相同的, 但他们都是同一受精卵的后代, 都是细胞有丝分裂的产物, 有丝分裂的均等性保证了这些细胞都具有相同的遗传组成, 它们在形态和功能上的差异是后天分化造成的, 是生物体自我控制系统对不同基因表达严格调节的结果。因为在个体发育过程中, 并非所有基因都同时发挥作用, 只有极少数基因终生发挥作用, 绝大多数基因发挥作用的时间很短, 它们表达的时间、位置与程序受体内调节

系统的严格控制。各种组织中的细胞, 即使是十分特化了的细胞, 都具有相同的遗传组成, 只要在合适的环境条件, 就可以解除分化, 发挥出初合子的功能, 发育出一个新的个体, 到目前为止, 几乎从所有植物的特化组织, 都诱出了再生株^[2,4,6]。

组织培养所形成的愈伤组织或再生植株, 由于细胞分裂都是有丝分裂, 每个细胞都是当初原始细胞的后裔, 基因型应当是一致的, 不当有遗传变异存在, 实际上无论有无诱变剂存在, 由组织培养产生的再生株后代都存在着大量的变异^[2]。

一种变异是染色体数目与结构的变异, 引起这种变异与组织培养时有丝分裂异染色质延迟复制有关。McCoy 和 Benzion 对这种变异机理研究的较深入, 他们选用的作物是燕麦和玉米。他们提出着丝粒区异染色质延迟复制引起染色体桥形成与断裂的假说, 常染色质在 S 期 (即 DNA 合成期) 复制而异染色质在 S 期后期复制, 组织培养条件下, 异染色质复制延迟得更多, 这样在细胞分裂后期, 染色单体的着丝粒, 在纺锤丝的牵引下向两极移动, 而在着丝粒周围的异染色质处, 由于尚未完成复制而彼此不能分开, 从而形成染色桥, 最后引起染色体断裂, 形成端着丝染色体和无着丝粒的染色体断片, 或者非同源染色体在断头处连接起来, 形成相互易位。这样就使得外植体经过一定时间的组织培养, 其愈伤组织或诱发的再生植株, 染色体数目和结构发生了广泛的变异^[2]。Rhoades (1984) 对小黑麦、蚕豆、马铃薯等作物再生植株的细胞学分析, 也同样表明了这一点^[2,7]。

另一种情况, 由组织培养产生的再生株也存在大量的基因突变, 它包括核基因突变和胞质基因突变^[2]。最容易识别的变异是形态方面变异, 在玉米中, Phillip (1987) 等人曾从再生株中分离出 45 个形态变异, 在马铃薯中, Wheeler (1985) 等人也发现了如花色、叶色、果肉色、果皮色、芽眼深浅和形状等简单突变, 也有一些数量性状变异, 如节间长度和薯块数量等变异。抗病性变异方面出现的频率一般比较高, 马铃薯再生株中, 大约 1% 是抗早斑病和晚疫病的。甘蔗再生株变异中, 抗斐济病、霜霉病和叶斑病的频率较高, 还有一些化学变异, 一般很难观察到, 它们对植株的外部形态没有影响或影响较小, 如同工酶突变、营养缺陷型突变、氮代谢或碳代谢突变、抗药性突变、抗逆性突变、抗

病性突变等^[2,8,9]。

3 马铃薯再生植株中变异株的研究内容和存在问题

3.1 外植体的选择

外植体是指从植物体上切取的用来进行组织培养的材料, 外植体的选择取决于研究的目的和植物的类型, 几乎所有植物的活体组织都可以用作外植体诱发愈伤组织或进行悬浮培养, 但特定的外植体是取得成功的必要条件, 双子叶植物再生能力比单子叶植物要强, 而单子叶植物又比裸子植物要强, 胚胎组织或幼嫩组织比老组织再生能力强, 营养体生殖部分分离的外植体比从有性生殖组织分离的外植体容易培养成功, 同一植株基部至顶端存在再生能力梯度^[2,10,11]。马铃薯组织培养使用的外植体是块茎产生的不定芽。

3.2 茎尖外植体的接种与再生植株的诱发

茎尖要事先进行清水、氯化汞消毒, 而后在解剖镜下剥离茎尖至 0.1~0.2 mm 大小, 置于 MS+KT 0.5+GA1 的固体培养基上, 要注意茎尖的极性, 生理上部位置的在培养基上仍然应当保持上部位置, 将来器官发生时自然会自然而然地上部出芽下部发根。接种后茎尖下部切割面组织会有少数细胞开始进行有丝分裂并形成愈伤组织, 愈伤组织最初是由一团无定形和无方向的疏松排列的薄壁细胞所组成, 并没有固定的可以预见的组织形式, 经过一段时间的培养, 愈伤组织发生一定程度分化, 形成导管细胞、筛管细胞、栓质细胞、分泌细胞和表皮细胞等, 通过对培养基细胞分裂素与生长素的调节, 经过 1~2 次继代培养, 逐渐器官发生, 诱发出再生植株, 当然为了增加变异株我们通常在组织培养过程中增设 γ 射线、X 射线、 β 射线、紫外线等辐射诱导处理。最后一次继代培养时适时练苗, 然后移植到已经消过毒的蛭石栽培盘中, 逐步过渡到大田自然条件下生长^[2,12,13]。

3.3 马铃薯再生变异株的识别方法与考评指标

一是室内细胞学行为直接鉴定。取马铃薯再生株田间移植 45 d 左右的旺盛苗茎尖, 在实验室进行体细胞有丝分裂期观察; 以及盛花期花粉母细胞减数分裂观察, 找出马铃薯染色体数目的整倍体变异或非整倍体变异, 尤其对单倍体、二倍体、双二倍体变异株进一步分类鉴定^[2]。

二是从形态学特征和生理特性上间接鉴定。常

用的性状考评指标有: 育性指标、器官性状指标、产量指标、抗病指标、抗逆(盐旱冷)指标。①育性指标: 二倍染色体结构的全育, 花蕾天然结实; 多倍体、双二倍体结构的部分可育; 染色体非整倍体变异、单倍体、三倍体结构的一般不育。②器官性状: 马铃薯多倍体变异往往引起植株分枝量减少, 开花延迟, 部分叶片肥大, 薯块变大等巨大性变异。双二倍体也有类似性状虽不及四倍体表现明显, 但较二倍体明显。其它变异植株有的壮大, 有的弱小需进一步考评其它指标, 准备将来单目标性状应用。③产量指标: 马铃薯的产品器官是地下块茎, 也是最终的产量来源。变异后茎尖组织分化形成的地下匍匐茎膨大机理必然与原品种有差异, 膨大期有时提前有时落后, 终止期有时提前有时落后, 测产时间要灵活掌握不可一概而论。④抗病指标: 分病毒性病害和真菌性病害(主要有环腐病、晚疫病、早疫病、疮痂病), 一般分为 1, 2, 3, 4, 5 五级制考评。⑤抗逆指标: 如抗旱性、耐盐性、耐冷性, 一般分为 1, 3, 5, 7, 9 五级制考评^[2,3]。

3.4 存在问题

组织培养条件再生植株器官形成时, 可能有许多愈伤组织参与, 而这些细胞的遗传成分有的是变异的, 有的是不变异的。后期表现的突变性状呈块状不均匀分布。造成具体育种鉴定的取样不确定性, 即细胞学分析、分生组织繁殖、器官繁殖、营养体繁殖的不确定性, 使变异染色体和变异性状传递不下去^[2,3]。

组织培养条件虽然比田间突变率高, 能保证大量的变异母体, 但从再生株所观察到的只限于植物形态方面变异, 而大量的化学突变如同工酶突变、营养缺陷型突变、基因 DNA 序列方面的某些突变还很难观察到, 有些良好变异株会擦肩而过, 消然丢失。

4 组织培养在马铃薯育种中的应用展望

组织培养是一种打破传统的新型繁衍后代方法, 能最大效率地利用空间, 使高等作物生长发育的“微生物化”, 田间马铃薯育种材料圃种植 45000 株/hm², 在组织培养室每 4 cm² 培养 1 株, 且能多层架放置培养瓶, 加上繁殖周期短, 变异母体材料扩大了 500~2000 倍。同时由于组织培养条

马铃薯转基因研究进展

王永锋 栾雨时*

(大连理工大学生物工程系, 大连 116024)

摘 要: 简要介绍马铃薯转基因技术方法, 着重对已获得的转抗真菌病基因、抗病毒基因、抗虫基因、改良品质基因的马铃薯的特征特性, 以及将马铃薯作为植物生物反应器来生产有用蛋白质和疫苗等方面的研究成果进行了综述, 同时还对转基因马铃薯的生物安全性作了评价和展望。

关键词: 马铃薯; 转基因; 安全性

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2004) 04-0227-05

马铃薯是世界上继小麦、水稻和玉米之后的第四大粮食作物, 其单位面积和单位时间的产量均高

于其他作物。我国是世界上马铃薯生产第一大国, 马铃薯产量的高低和品质的优劣对我国马铃薯产业的发展至关重要。目前, 我国在马铃薯生产上还存在诸多问题, 如病虫害严重、品质不佳等, 致使种植业者的收入微薄、积极性不高。近年来, 随着植物基因工程技术的发展, 陆续培育出了一些优质、

收稿日期: 2004- 06- 04

作者简介: 王永锋 (1978-), 男, 大连理工大学硕士, 研究方向为分子生物学。

* 通讯作者: luan yushi@yahoo.com.cn

件使染色体突变率的增强, 若再增设人工诱导突变剂, 提高了变异率, 所以组织培养在马铃薯育种是一种很有潜力的方法^[13]。

从 20 世纪 90 年代至今, 随着细胞分子领域的深入, 基因 DNA 序列的测定, 人类对生命的微生理化, 为现代生物技术辅助育种成为可能, 至今已有许多作物成功地进行基因转移、表达基因调控、体细胞无性系杂交、细胞器移植、花粉单倍体培养、单倍体加倍纯合等, 而这些辅助育种手段都离不开组织培养。

可见, 21 世纪开展马铃薯及其它作物育种, 应用组织培养技术势在必行, 前景美好。

参 考 文 献

- [1] 谢开云, 屈冬玉. 中国马铃薯育种进程[A]. 中国马铃薯年会论文集[C]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2002. 5-9.
- [2] 李竞雄, 宋同明. 植物细胞遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 307-348.
- [3] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京: 金盾出版

社, 2003. 1-70.

- [4] 王纪方, 金波. 蔬菜组织培养[M]. 上海: 上海科技出版社, 1993. 3-20.
- [5] 汤芳德, 刘耀宗. 马铃薯大全[M]. 北京: 海洋出版社, 1992. 151-209.
- [6] 崔微, 桂耀林. 经济作物的组织培养与快速繁殖[M]. 北京: 农业出版社, 1985. 15-40.
- [7] 杨乃博. 试管植物名录[J]. 植物生理学通讯, 1982, (4): 61-80; (5): 59-71.
- [8] 周美瑛. 植物组织培养和细胞培养的研究和应用[J]. 中国农学通讯, 1985, (5): 41-43.
- [9] 蒋卫杰, 刘伟. 蔬菜无土栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2001. 43-74.
- [10] 徐振华, 白志英. 月季试管苗的形态解剖学观察[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 405-407.
- [11] 赵惠祥. 梨茎尖离体培养[J]. 植物学报, 1982, 24(3): 392-394.
- [12] 邵莉楣, 孟小雄. 植物生长调节剂应用手册[M]. 北京: 金盾出版社, 2000. 5-24.
- [13] 西北农学院. 作物育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1991. 66-78.